

EP 44623 (1)



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 57 128 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
G 01 N 33/483
G 01 N 27/64
C 12 Q 1/04
C 12 Q 1/70

⑲ Aktenzeichen: 101 57 128.3
⑳ Anmeldetag: 13. 11. 2001
㉑ Offenlegungstag: 22. 5. 2003

DE 101 57 128 A 1

⑦ **Anmelder:**

Lasert- und Medizin- Technologie GmbH, 14195
Berlin, DE; IUT Institut für Umwelttechnologien
GmbH, 12489 Berlin, DE

⑫ **Erfinder:**

Leonhard, Jürgen, Prof., 10179 Berlin, DE; Müller,
Gerhard, Prof. Dr.-Ing., 14129 Berlin, DE; Katzung,
Walter, Dr., 10117 Berlin, DE; Bindig, Uwe, Dr.,
14167 Berlin, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

④ Verfahren und Vorrichtung zum gezielten und spezifischen Nachweis bakterieller Sporen

⑤ Die Erfindung betrifft ein Echtzeitverfahren zum Schnelltest auf bakterielle Kontaminanten. Durch eine Kombination von pyrolytischem Aufschluß, Kapillartrennungsverfahren und Ionen-Mobilitäts-spektrometrie wird eine biochemische repräsentative Signatur der bakteriellen Kontamination gemessen. Neben der prinzipiellen Detektion einer Belastung der Raum/Umgebungsluft kann auch eine direkte Kontrolle in der Ausatemluft von Personen erfolgen.

DE 101 57 128 A 1

1
Beschreibung
Aufgabenstellung

[0001] Sporen werden von einigen Gram-positiven Bakterien in Reaktion auf bestimmte Reize gebildet. Sporen stellen aufgrund ihrer Konstitution langlebige Bioobjekte dar. Diese ermöglichen das Überleben eines Spezies selbst unter widrigen Bedingungen, stellen jedoch als pathogene Bakterien für die Gesundheit der Menschen eine dauerhafte Gefährdungsquelle dar.

[0002] Die konventionelle mikrobiologische Diagnostik im Labor ist schwierig und erfolgt über Aktivierung, Anzüchtung und Anfärbeverfahren. Diese Methoden sind personal- und zeitaufwendig, kostenintensiv und unterliegen einer subjektiven Beurteilung. Ein neues Lichtzeitverfahren soll hierzu für den schnellen Nachweis von Sporen ermöglichen.

Stand der Technik

[0003] Sporen stellen eine langlebige und erneut reaktivierbare biologische Erscheinungsform der Keimzellen definierter Mikroorganismen dar. Nach dem Ursprung wird in bakterielle oder nichtbakterielle Sporen unterschieden. Extreme Umweltbedingungen oder andere ungünstige Verhältnisse (fehlende Nährstoffe, Anhäufung von Stoffwechselprodukten) stellen die Ursache für die Bildung bakterieller Sporen dar. Auf Basis von Veränderungen im Metabolismus, der Stoffumwandlung durch Verwertung von Depotsubstanzen wird als sporenspezifische Substanz vernichtete Dipicolinsäure synthetisiert. Die Reduktion des zellulären Wassergehaltes, die Bildung langlebiger chemischer Substanzen und durch physikalische Prozesse verändert sich die morphologische Struktur der Keimzelle. Polyterpene bzw. Polypeptide stellen u. a. den Hauptbestandteil der Zellwandsubstanzen von Sporen dar. Die mehrschichtige Umhüllung der Spore kann bis zu 50% der Trockenmasse betragen. Reife Endosporen lassen keine Stoffwechselaktivität erkennen und verfügen über einen hohen Grad von Resistenz gegenüber thermischer, chemischer oder strahlungsbedingter Exposition. Für eine Keimung der Sporen ist nicht nur die Quelle durch Wasser essentiell sondern häufig auch eine Lichtinduktion erforderlich.

[0004] Speziell zur Gefahrenerkennung ist eine dauerhafte Überwachung sensibler Bereiche unabhängig, da ein hohes Gefährdungspotential gegeben ist. Zum Nachweis luftgetragener Kontaminationen müssen i. d. R. zeitaufwendige, mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt werden.

[0005] In der Anforderung an die neue Technologie soll neben einer tragbaren Apparatur auch eine einfache Handhabung sichergestellt sein. Derzeit sind Methoden zur direkten Detektion ohne Zeitverlust zwischen Probenahme und Messergebnis nicht bekannt. Als Verfahren werden neben einfachen Transmissions- und Reflektionsmessungen, Pyrolyse mit Gaschromatographischer Trennung und IMS-Detektion, Massenspektroskopische Verfahren wie MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight spectrometry), auto/fluoreszenzoptische Verfahren, molekularbiologische Methoden (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assays und auf PCR (Polymerase chain reaction) beruhende Verfahren angegeben. Verfahren die zur Charakterisierung als Parameter lediglich die Partikelverteilung anhand von Durchmessern und Partikelform verwenden haben sich für die Analyse und den Nachweis aus komplexen Bioaerosolen nicht bewährt. Alle diese Verfahren bedingen einen hohen apparativen Aufwand und verlangen vom Anwender detailliertes Spezialwissen oder weisen eine zu

geringe Sensitivität und Selektivität auf. Eine direkte Messung ohne größeren Zeitverlust ist somit nicht möglich. Dies hat für eine korrekte Diagnosestellung und Einleitung entsprechender Gegenmaßnahmen fatale Folgen.

Erfindungsgemäße Lösung

[0006] Erfindungsgemäß sollen beispielhaft anhand der Sporen der Gattung *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus anthracis* die Charakterisierung in luftgetragenen Bio/Aerosolen mittels verschiedener Messprinzipien, die alle erfindungsgegenständlich sind, erfolgen.

[0007] Erfindungsgemäß erfolgt nach der Probenvorbereitung ein Probenaufschluss. Bestandteil des Aufschlussmechanismus ist die photothermische Pyrolyse unter Verwendung geeigneter Vorrichtungen. Als Vorrichtung wird eine Kapillare verwendet. Diese Hohlkörper/Kapillare besteht z. B. aus Saphirmaterial. Neben der Funktion innerhalb des Aufschlussmechanismus erfolgt synchron die Verwendung für einen Trennungsmechanismus. Im bevorzugten Ausführungsbeispiel ist der Durchmesser und die Größe der Saphirkapillare der spezifischen Messaufgabe angepasst. Eine Beschichtung der inneren Oberfläche u/o, eine Dotierung mit geeigneten Materialien ist in Weiterführung des Erfindungsgedankens vorgesehen.

[0008] In dem bevorzugten Ausführungsbeispiel kommt es innerhalb der Hohlkapillare aufgrund von Diffusion und Konvektion zu Auftrennungseffekten an der modifizierten Kapillarinnenwand, welches eine gezieltere Detektion ermöglicht.

[0009] Erfindungsgemäß erfolgt die Pyrolyse durch Interaktion der u. a. mit Sporen belasteten Gasphase mit einem Laserstrahl definierter Leistungseigenschaften und Wellenlängen. In dem bevorzugten Ausführungsbeispiel wird als Laser z. B. ein CO₂-Laser verwendet. Die Anknüpfung der Energie erfolgt durch Strahlungsabsorption im Wellenlängenbereich von ca. 9-11 µm. Für den Energietransfer werden organische Verbindungen der Sporen in-situ genutzt. In Fortführung des Erfindungsgedankens eignen sich für die Anwendung auch andere Laser im Spektralbereich 0,15 µm-15 µm.

[0010] In einem weiteren Ausführungsbeispiel erfolgt die Pyrolyse der Sporen an katalytischen Oberflächen wie z. B. thermisch aufgetragenen Platinnetzen; Bevorzugt jedoch oder katalytisch dotierten/beschichteten Kapillaren und Kapillarbündeln. Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass bei der pyrolytischen Zersetzung des u. a. mit Sporen kontaminierten Aerosols charakteristische Fragmente der beispielhaft genannten Sporen entstehen. In dem bevorzugten Ausführungsbeispiel werden diese volatilen Komponenten messtechnisch spezifisch nachgewiesen, wobei in einem erfindungswesentlichen Schritt ein Ionen-Drift-Sensor nach dem Stand der Technik verwendet wurde. In einem weiteren erfindungswesentlichen Schritt erfolgte der Nachweis dieser Pyrolysefragmente mit laserspektroskopischen Methoden. In Weiterführung des Erfindungsgedankens wurden derartige Kapillaren/Kapillarbündel mit Methoden der Sol-Gel-Technik beschichtet und überraschenderweise konnten mit speziellen stabilen molekularen Sensitoren über Fluoreszenzanregung oder Quenchingschritte Bestandteile der Sporen unmittelbar nachweisen werden. In Weiterführung des Erfindungsgedankens ist im Vorfeld zur effektiven Kondensation partikulärer Bestandteile des Aerosols – d. h. Konzentrierung – durch die Zugabe von Gas wie z. B. von Wasserlump auf Oberflächen vorgesehen.

[0011] Erfindungsgemäß erfolgt die Detektion der Laserpyrolyseprodukte mittels eines höchstempfindlichen Ionen-Drift-Detektors der Firma I. U. T./Berlin. Merkmal des De-

tektors/Sensors sind die Ionisierung der volatilisierten chemischen Pyrolyseprodukte mittels Tritium. Des weiteren ermöglicht die kapazitive Beschleunigungsstrecke für die Ionen in der Gasphase bei Normaldruck eine höchstempfindliche Erfassung. Über chemometrische Auswertprogramme erfolgt die Zuordnung der erfassten spektroskopischen Daten. Eine der in Fortführung des Erfindungsgedankens nachzuweisenden Leitkomponenten aus der pyrolytischen Zersetzung der Sporen (Taxonomie) sind u. a. Fragmente und/oder Reaktionsprodukte von bio-organischen Verbindungen (hochmolekulare Terpene, Picolinsäure und Lipide sowie deren Kondensations- und Reaktionsprodukte).

[0012] Erfindungsrelevant ist des weiteren die Gewährleistung der Temperaturstabilität im Bezug auf konstante Pyrolysebedingungen in Hinsicht auf die Reproduzierbarkeit des Verfahrens. Im bevorzugten Ausführungsbeispiel ist mit Blick auf Arbeitshygiene und Desinfektion die Gewährleistung der vollständigen Eliminierung bakterieller pathogener Erreger oder luftgetragener Sporen u. a. in der Hohlfasern/Kapillaranalyse durch den Reinigungseffekt eines hochenergetischen Laserstrahls gegeben.

[0013] Im Bio/Aerosol sind zeitgleich diverse bakterielle Mikroorganismen der Umgebungsluft (Belastung mit Pilzen, Pollen etc.) enthalten, deren Konzentration/Volumen konnte überraschenderweise infolge einer Vorreinigung zugunsten des Analyten reduziert werden. Neben der prinzipiellen Detektion einer Belastung der Raum/Umgebungsluft ist Gegenstand der Erfindung die direkte Kontrolle in der Atemluft kontaminierter und nicht-kontaminierter Personen (Alveolar positiv/negativ) gegenüber einer Hintergrundbelastung.

[0014] In Fortführung des Erfindungsgedankens ist in einem zusätzlichen erfindungsrelevanten Verfahrensschritt die Aufkonzentrierung der Sporenpyrolyseprodukte zum Zwecke der Detektion vorgesehen.

[0015] In dem bevorzugten Ausführungsbeispiel erfolgt die Stoffstromführung im Gegenstrom zur Laserstrahl-einkopplung. In Weiterführung des Erfindungsgedankens sind weitere technische Lösungen vorgesehen.

[0016] In Fortführung des Erfindungsgedankens ist ebenso eine Detektion von Kontaminationen mit viralen Erregern, den Bakteriophagen wobei Viren aus DNA/RNA-Anteilen und einer Proteinhülle bestehen. Beispielfähig anhand von Pockenviren durchgeführt, möglich.

[0017] Die Erfindung ist in den Abb. 1-7 erläutert:

[0018] Abb. 1 Kapillare/Hohlfasern und Kapillarbündel/Array

[0019] Abb. 2 Laserstrahlführung und Stoffstrom erfolgt in gleicher Richtung (Gleichstromverfahren). Vorrichtung mit einer Kapillare oder Kapillarbündel

[0020] Abb. 3 Laserstrahlführung und Stoffstrom in gleicher Richtung (Gleichstromverfahren). Vorrichtung mit Einzelkapillare (6.), der Laserstrahl wird seitlich eingekoppelt (3.), externe Laserleistungsmessung (4.b), nach Pyrolyse in 6. erfolgt die IMS-Detektion (8).

[0021] Abb. 4 Laserstrahlführung und Stoffstrom in gleicher Richtung (Gleichstromverfahren). Vorrichtung mit Kapillarbündel/array (6.), der Laserstrahl wird seitlich eingekoppelt (3.), externe Laserleistungsmessung (4.b), nach synchroner Pyrolyse in 6. erfolgt die IMS-Detektion (8).

[0022] Abb. 5 Laserstrahlführung und Stoffstrom in gleicher Richtung (Gleichstromverfahren). Vorrichtung mit Kapillarbündel/array (6.), der Laserstrahl wird seitlich eingekoppelt (3.), externe Laserleistungsmessung (4.b), nach Pyrolyse in der ersten Kapillare, werden unterschiedlich dotierte Kapillaren zur Auftrennung verwendet, dann erfolgt die IMS-Detektion (8).

[0023] Abb. 6 Laserstrahlführung und Stoffstrom in gegen-

gegangener Richtung (Gleichstromverfahren). Vorrichtung mit austauschbaren, individuell dotierten Einzelkapillaren (6.), durch Dreh- oder in Form einer Verschiebeeinheit kann die Position der Kapillaren verändert werden. Der Laserstrahl wird seitlich eingekoppelt (3.), externe Laserleistungsmessung (4.b), nach Pyrolyse in 6. erfolgt die separate IMS-Detektion (8) für jede Einzelkapillare.

[0024] Abb. 7 Laserstrahlführung und Stoffstrom in entgegengesetzter Richtung (Gegenstromverfahren). Vorrichtung mit austauschbaren, individuell dotierten Einzelkapillaren (6.), durch Dreh- oder in Form einer Verschiebeeinheit kann die Position der Kapillaren verändert werden. Der Laserstrahl wird seitlich eingekoppelt (3.), externe Laserleistungsmessung (4.b), nach Pyrolyse in 6. erfolgt die separate IMS-Detektion (8) für jede Einzelkapillare.

Patentansprüche

1. Verfahren und Vorrichtung zum Schnelltest auf bakterielle Kontaminationen dadurch gekennzeichnet, dass durch eine Kombination von pyrolytischen Aufschluss, Kapillartrennungsverfahren und Ionen-Mobilitäts-Spektrometrie eine biochemische repräsentative Signatur der bakteriellen Kontamination gemessen wird.
2. Verfahren und Vorrichtung nach 1, dadurch gekennzeichnet, dass Laserstrahlung im spektralen Bereich von 0,15 - 15 µm zur Pyrolyse verwendet wird.
3. Verfahren und Vorrichtung nach 1, dadurch gekennzeichnet, dass in dem bevorzugten Ausführungsbeispiel ein CO₂-Laser verwendet wird.
4. Verfahren und Vorrichtung nach 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Excimer-Laser (Xenonchlorid 308 nm) eingesetzt wird.
5. Verfahren und Vorrichtung nach 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein inneres Platinnetz zur inneren Pyrolyse verwendet wird.
6. Verfahren und Vorrichtung nach 1, dadurch gekennzeichnet, dass die schnelle Aufheizung des Probenvolumen mit einem Laser erfolgt.
7. Verfahren und Vorrichtung nach 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Einkopplungselement in Verbindung mit dem Ionen-Drift-Sensor steht.
8. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Einkopplungselement eine Trennstruktur enthalten ist.
9. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass zur Laserstrahlführung eine beschichtete Kapillare verwendet wird.
10. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass der pyrolytische Aufschluss innerhalb der Kapillare erfolgt.
11. Verfahren und Vorrichtung nach 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Pyrolyse bakterieller Kontaminationen vor der Ionisierung erfolgt.
12. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass ein besonderes Kopplungsglied zur Laserstrahlführung eingesetzt wird.
13. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass in dem bevorzugten Ausführungsbeispiel die Stoffstromführung entgegengesetzt zur Laserstrahlrichtung erfolgt.
14. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass ein konstanter Luftstrom über die Kopplungsstrecke geführt wird.
15. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass eine Hohlfasern/Kapillare deren innere Oberfläche modifiziert und der Messaufgabe angepasst werden kann genutzt wird.

16. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass die Hohlaser/Kapillare(n) aus Saphirmaterial sind.

17. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass ein Kapillarbündel Anwendung findet.

18. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass die Hohlaser/Kapillare(n) in ihrer geometrischen Form der spezifischen Messaufgabe angepasst werden.

19. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass für die Gasanalogie der Hohlaser/Kapillare(n) eine Temperaturnähe durch die Laserpyrolyse erzielt wird.

20. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass die Pyrolyse in einer Kapillare erfolgt und die verbleibenden Kapillaren des Kapillarbündels gleich oder unterschiedlich beschichtet oder in Teilstücken für die Trennung Anwendung finden.

21. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass Hohlaser/Kapillarbündel als Aufreinigungseinheit dienen.

22. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass die innere Oberfläche der Hohlaser/Kapillare(n) durch Dotierung/Belegung aktiviert wird.

23. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass durch eine aktivierte Oberfläche der Hohlaser/Kapillare(n) Trennungseffekte erzielt werden.

24. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass ein Kapillarbündel im Sinne einer Revolverschaltung - wobei auch andere technische Lösung erfindungsgemäß sind - über ein Kopplungsglied in dem bevorzugten Ausführungsbeispiel mit der Möglichkeit der separaten externen Leistungsmessung mit dem Sensor gekoppelt ist.

25. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass die Reinigung der Hohlaser/Kapillare(n) durch den Laserstrahl erzielt wird.

26. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass eine Anreicherung von Kontaminanten durch geeignete Filtersysteme erreicht wird.

27. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass die Anreicherung von Kontaminationspyrolyseprodukten eine Steigerung der höchstsensitiven Detektion ermöglicht.

28. Verfahren und Vorrichtung nach 1, 2-6 und 7-27, dadurch gekennzeichnet, dass ein hochempfindlicher Ionen-Drift-Sensor der Form I, II, III zur Detektion verwendet wird.

29. Verfahren und Vorrichtung nach 1, 2-6 und 7-27, dadurch gekennzeichnet, dass Gase für eine Kondensation partikulärer Bestandteile aus der Umgebungsluft genutzt wird.

30. Verfahren und Vorrichtung nach 1, 2-6 und 7-27, dadurch gekennzeichnet, dass als Gas zur Kondensation Wasserdampf Anwendung findet.

31. Verfahren und Vorrichtung nach 1, 2-6, 7-27, dadurch gekennzeichnet, dass ein inertes Gas zur Pyrolyse hinzugesetzt wird.

32. Verfahren und Vorrichtung nach 1, 2-6, 7-27, dadurch gekennzeichnet, dass ein gasförmiger Reaktant hinzugeführt wird.

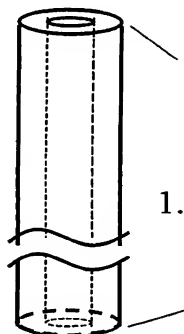
33. Verfahren und Vorrichtung nach 1, 2-6, 7-27, dadurch gekennzeichnet, dass als Kopplungselement eine

Miniaturlinierung der Detektoreinheit als IMS-Chip im Rahmen der Mikrosystemtechnik angewandt wird.

34. Verfahren und Vorrichtung nach 1 und 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass als Kontaminanten Bakteriosporen z. B. Pockenviren in dem gasförmigen Strom nachweisbar sind.

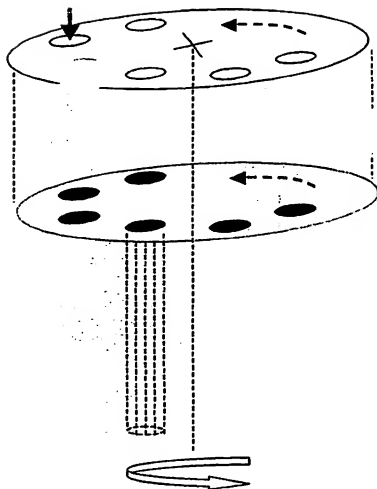
Hierzu 7 Seiten Zeichnungen

- Leerseite -



1. Kapillare/Hohlfaser

2.



2. Kapillarbündel/Array, im Block oder Gestell
die Kapillaren sind Einzeln austauschbar

Abb.1

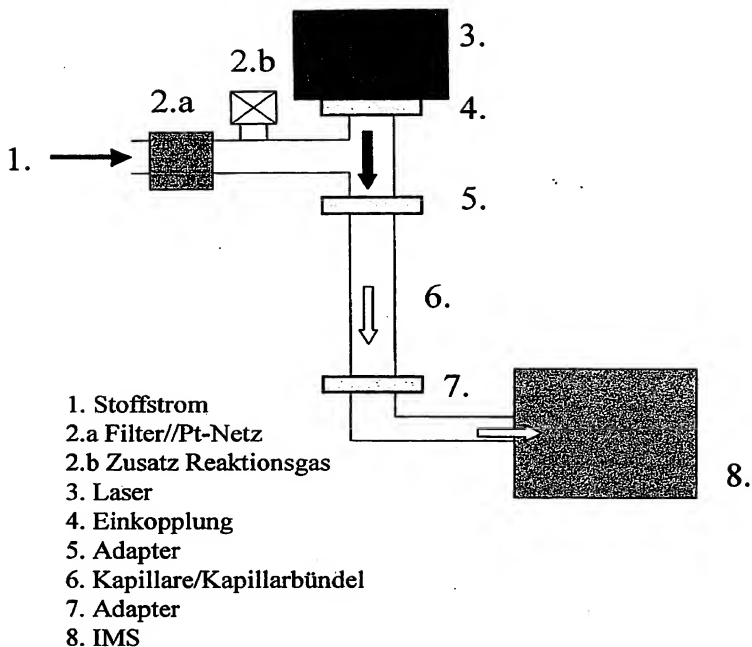
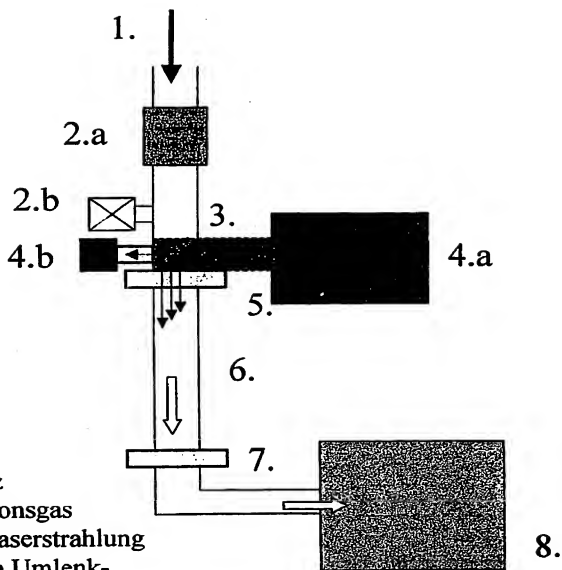


Abb.2



1. Stoffstrom
- 2.a Filter//Pt-Netz
- 2.b Zusatz Reaktionsgas
3. Einkopplung Laserstrahlung
über perforiertem Umlenk-
spiegel/filter
- 4.a Laser
- 4.b externer Leistungsmesser
5. Adapter
6. Kapillare/Kapillarbündel
7. Adapter
8. IMS

Abb.3

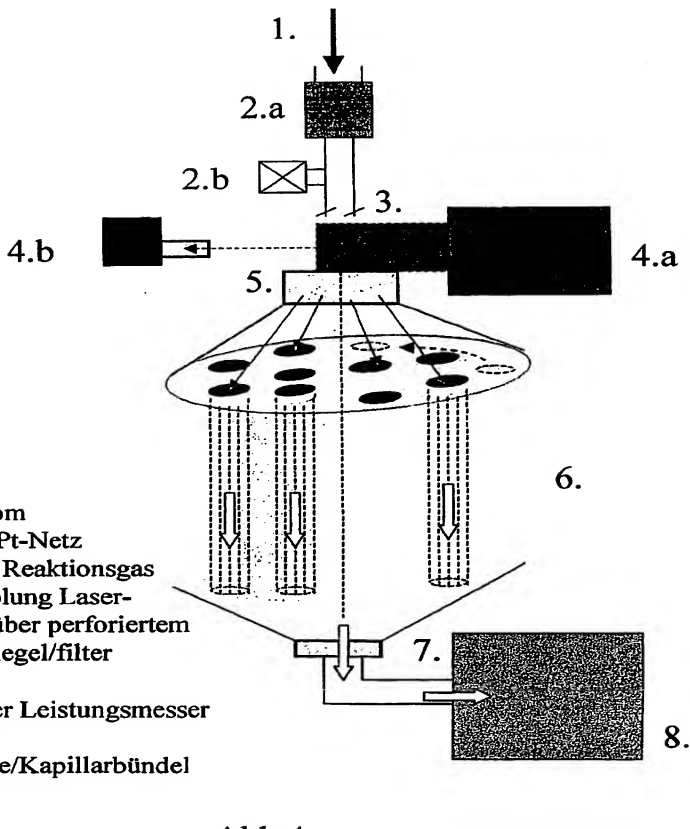


Abb.4

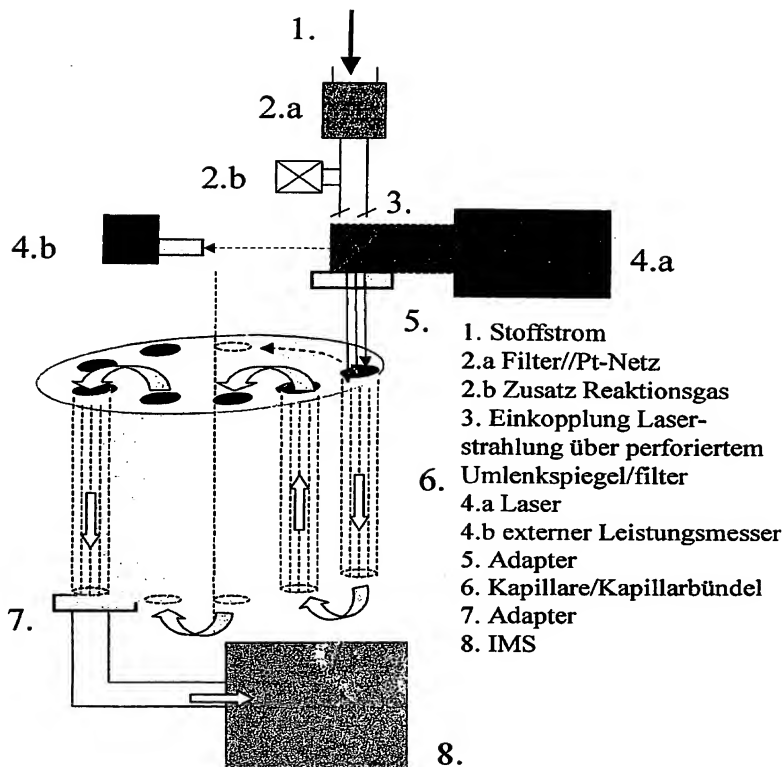


Abb.5

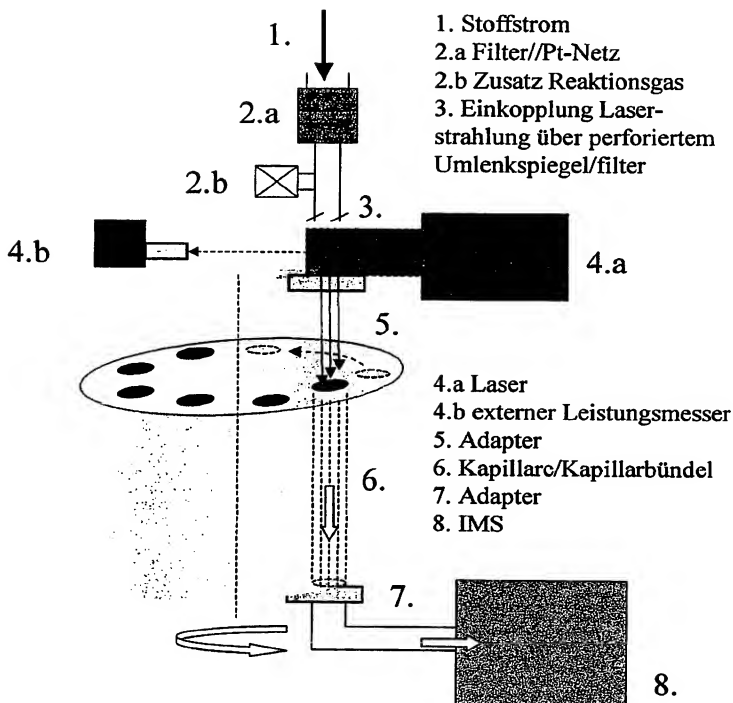


Abb.6

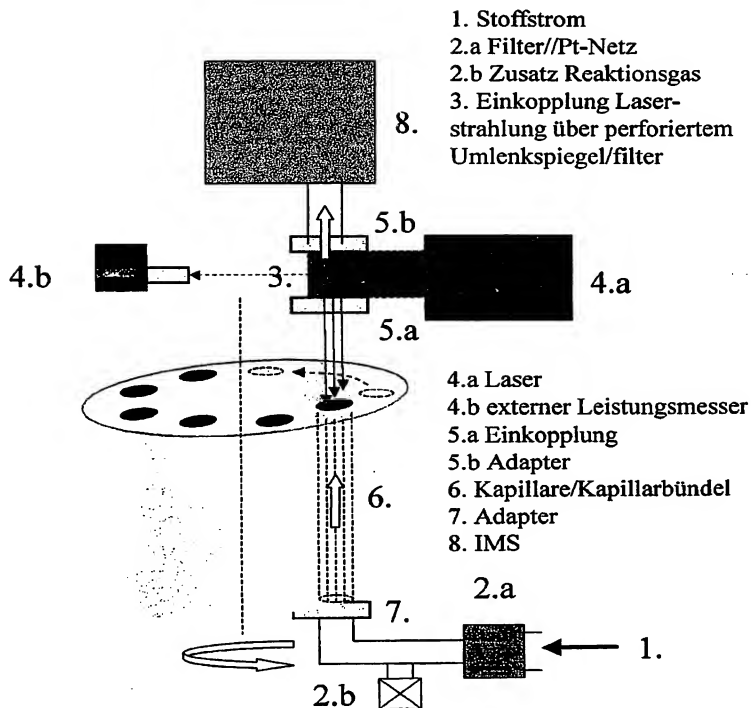


Abb.7